

1. Tijekom šaržnog uzgoja u bakterijskim stanicama se nakuplja rekombinantni protein. Rekombinantni protein se oslobađa razbijanjem stanične stijenke stanica u Manton-Gaulinovu visokotlačnom homogenizatoru pri radnom tlaku od 20 do 55 MPa. U tablici su prikazani udjeli oslobođenog proteina (%) pri različitom broju obrade suspenzije stanica u visokotlačnom homogenizatoru:

N	udjel proteina (%)				
	p (MPa)				
	20	30	40	50	55
1	5	13,5	23,3	36	42
2	9,5	23,5	40	58,5	66
3	14	33,5	52,5	75	83,7
4	18	43	66,6	82,5	88,5
5	22	47	73	88,5	94,5
6	26	55	79,5	91,5	-

a) Koliko je puta potrebno propustiti suspenziju stanica u visokotlačnom homogenizatoru da se oslobodi 80 % unutarstaničnih proteina pri radnom tlaku od 46 MPa?

b) Koliki radni tlak je potreban da se oslobodi 70 % unutarstaničnih proteina ako se suspenzija stanica propušta tri puta kroz homogenizator?

Kinetika razbijanja stanične stijenske stanica definirana je jednačbom:

$$\ln \frac{1}{1 - R / R_{\max}} = k \cdot p^{\alpha} \cdot N$$

R – koncentracija oslobođenih proteina

$R_{\max}$  - maksimalna koncentracija proteina

p- radni tlak (Pa)

k-konstanta homogenizatora ( $\text{Pa}^{-\alpha}$ )

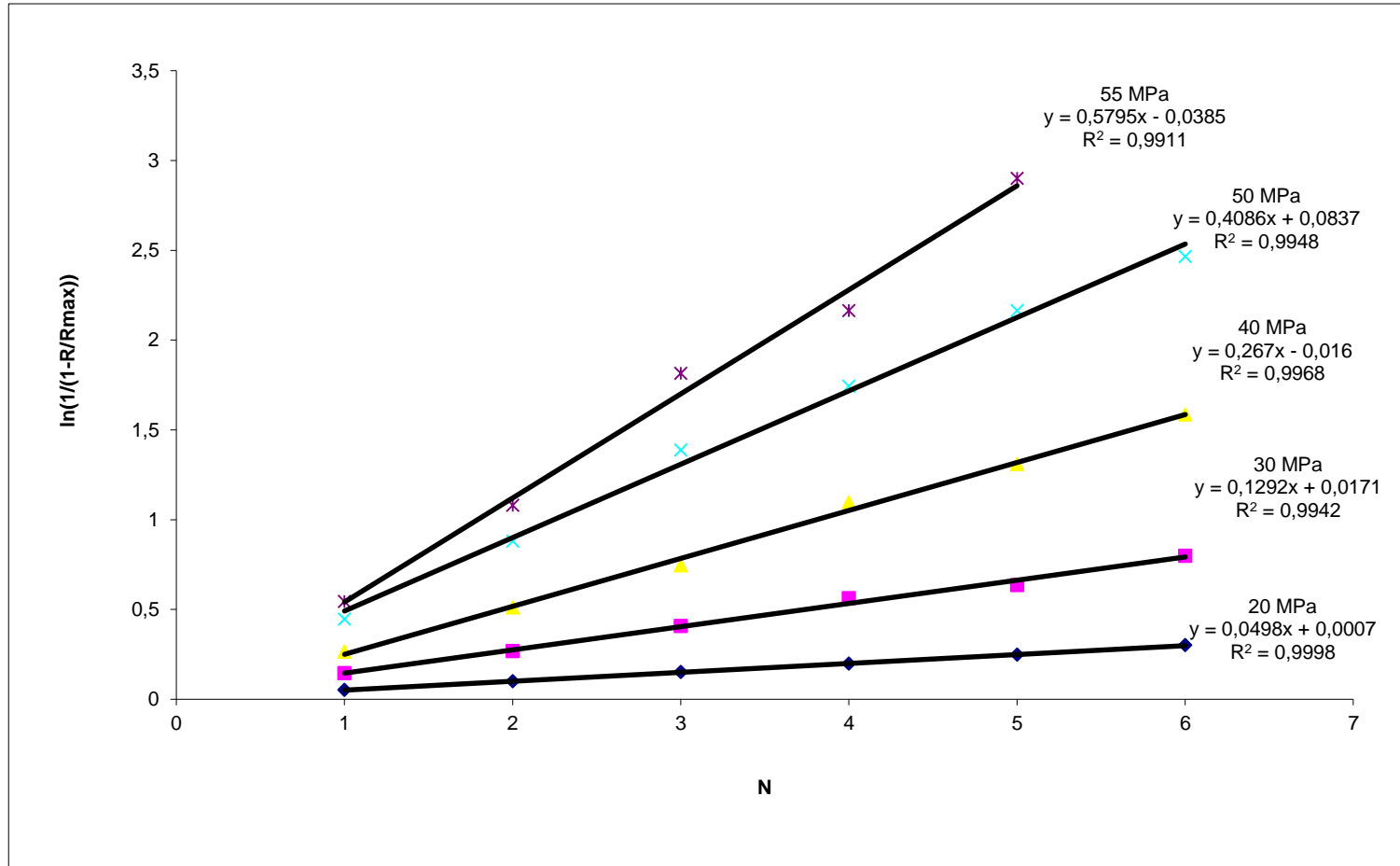
$\alpha$ - konstanta karakteritična za određen mikroorganizam (npr. za kvasac *S. cerevisiae* 2,9, a bakteriju *E. coli* 2,2)

N - broj propuštanja supenzije kroz visokotlačni homogenizator

$$K = k \cdot p^{\alpha}$$

$$\ln \frac{1}{1 - R / R_{\max}} = K \cdot N$$

$$\ln \frac{1}{1 - R / R_{\max}} = K \cdot N$$



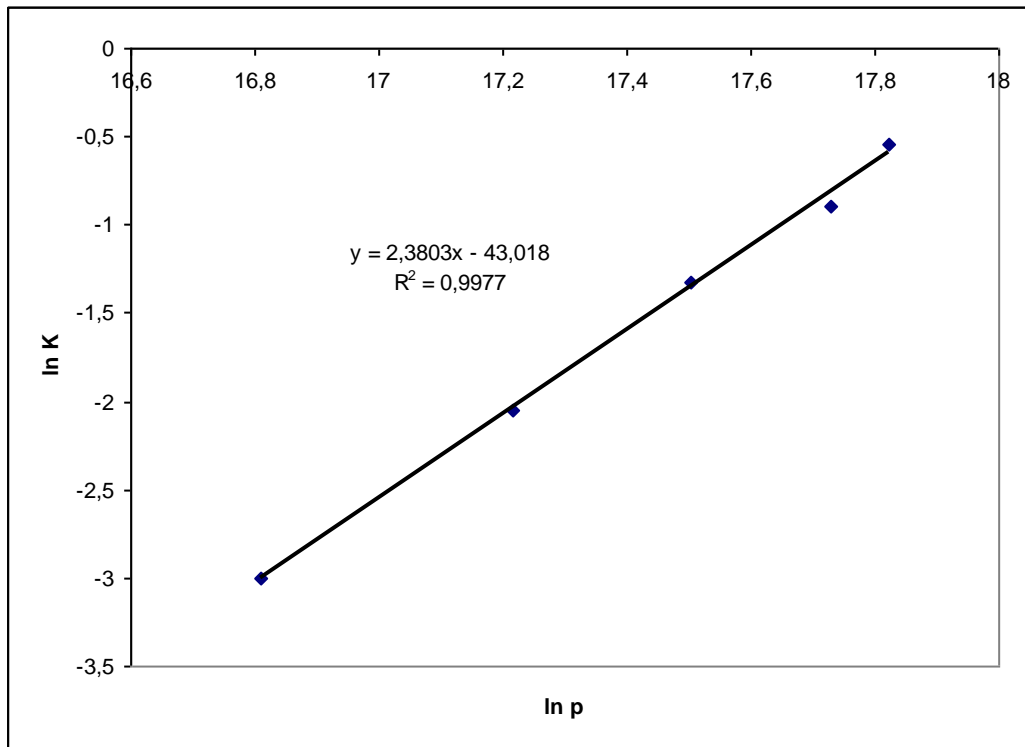
$$K = k \cdot p^\alpha$$

$$\ln K = \alpha \ln p + \ln k$$

$$K = k \cdot p^\alpha$$

$$\ln K = a \ln p + \ln k$$

<b>p (Pa)</b>	<b>K</b>	<b>ln p</b>	<b>ln K</b>
$2 \times 10^7$	0,0498	16,81124	-2,99974
$3 \times 10^7$	0,1292	17,21671	-2,04639
$4 \times 10^7$	0,267	17,50439	-1,32051
$5 \times 10^7$	0,4086	17,72753	-0,89502
$5,5 \times 10^7$	0,5795	17,82284	-0,54559



Koeficijent smjera  $\alpha = 2,3803$

$\ln k = -43,018$

$k = 2,077399 \cdot 10^{-19} \text{ Pa}^{-2,38}$

$$\begin{aligned} \text{a) } K &= k \cdot p^\alpha \\ &= 2,077399 \text{ e-19} \cdot (44\text{e6})^{2,3803} = 0,3245 \\ \ln(1/(1-0,8/1)) &= 0,3245 \cdot N \\ N &= 4,95 \text{ (5 prolaza)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b) } \ln(1/(1-0,7/1)) &= K \cdot 3 \\ K &= 0,4013 \\ p &= \sqrt[2,3803]{0,4013/2,077399\text{e}^{-19}} = 48 \text{ MPa} \end{aligned}$$

2. Tijekom šaržnog uzgoja u stanicama kvasca nakuplja se rekombinantni terapijski protein. Suspenzija stanica obrađuje se u kugličnom mlinu. Količina ukupno oslobođenog proteina tijekom obrade u mlinu prikazana je u tablici:

t (min)	protein (g)
1	400
2	990
3	1200
4	1100
5	1410
6	1425
7	1475
8	1473
9	1483
10	1490

Koncentracija stanica na kraju uzgoja iznosila je 30 g/L, a ukupan volumen hranjive podloge bio je 100 L. Kvasac sadrži 50 % proteina po gramu suhe tvari.

- Odredite specifičnu brzinu razbijanja stanične stijenke kvasca ( $k$ ).
- Izračunajte koliko je vremena potrebno da se oslobodi 80% proteina iz stanice kvasca.



Kinetika razbijanja stanica definirana je kinetikom prvog reda.

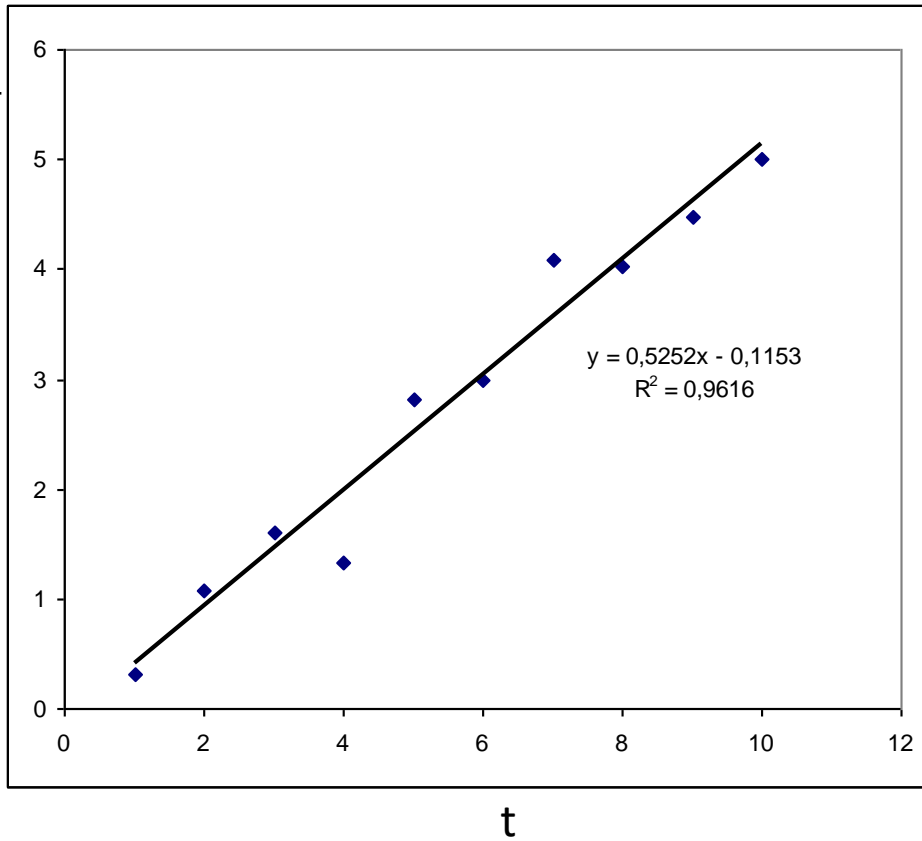
$$\ln \frac{R_{\max}}{R_{\max} - R} = k \cdot t$$

R- udjel oslobođenog proteina (%)

$R_{\max}$  – maksimalni udjel proteina (%)

k- specifična brzina razbijanja stanicea ( $s^{-1}$ )

$$\ln \frac{R_{\max}}{R_{\max} - R}$$



$$k = 0,5252 \text{ s}^{-1}$$

$$t = 3,06 \text{ min}^{-1}$$

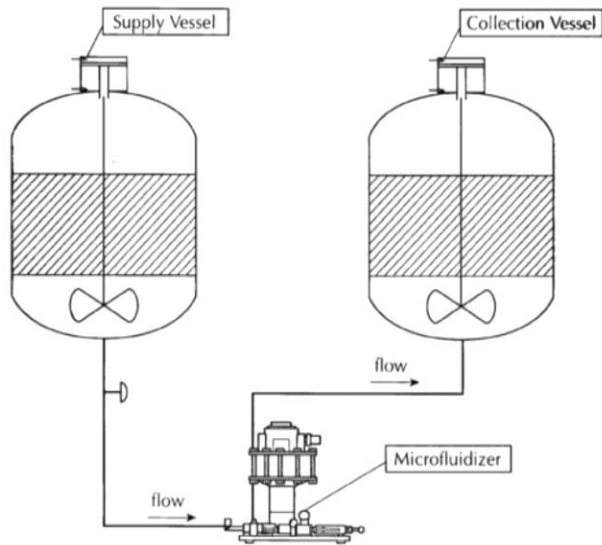
3. Potrebno je provesti postupak razbijanja stanice kvasca u visokotlačnom homogenizatoru (Manton—Gaulinov homogenizator). Volumen stanične suspenzije iznosi 3800 L, a zadani protok kroz homogenizator iznosi 190 L/min. Suspenziju stanica potrebno je obraditi u visokotlačnom homogenizatoru tako da se minimalno 99 % (vol/vol) volumena suspenzije obradi najmanje četiri puta u homogenizatoru.

a) Koliko traje postupak razbijanja stanica ako se on provodi:

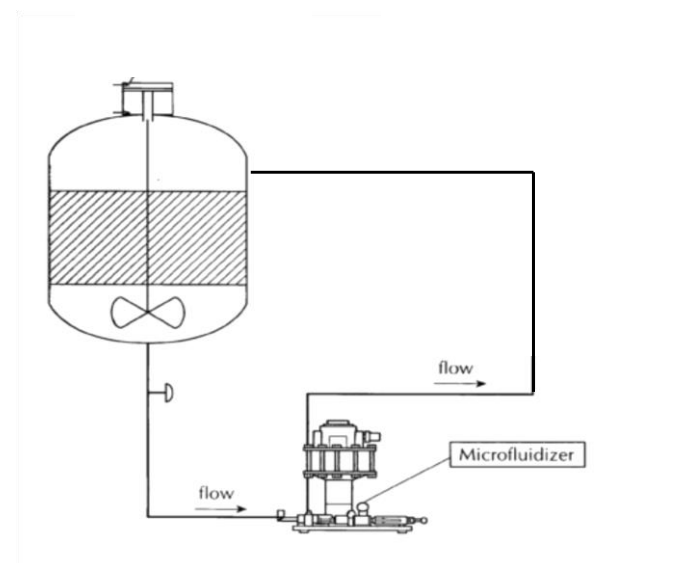
- šaržno s jednim homogenizatorom
- četiri homogenizatora u seriji
- šaržno s jednim homogenizatorom uz kontinuirano recikliranje suspenzije?

b) Koliko iznosi udjel volumena suspenzije koji je obrađen 10, odnosno 20 i više puta u šaržnom postupku s recikliranjem suspenzije?

c) Koliko bi trajao proces obrade s reciklacijom ako se volumni udjel suspenzije (f) koja ja obrađena najmanje 4 puta smanji s 99 % na 95%?

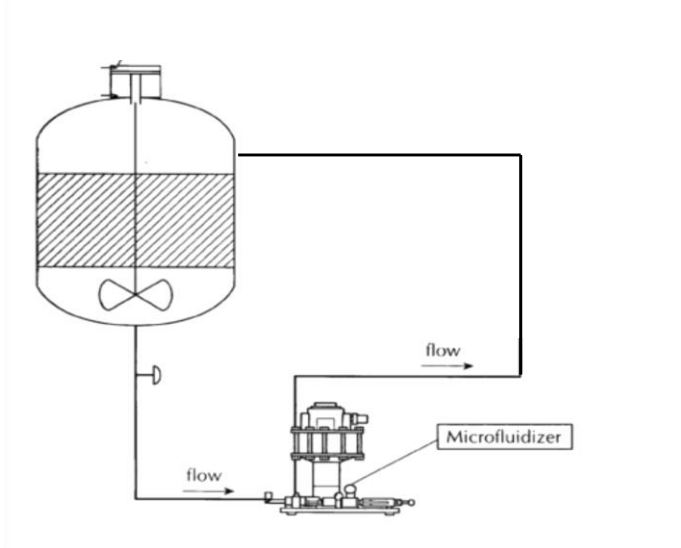


Šaržni postupak s jednim visokotlačnim homogenizatorom



Šaržni postupak s kontinuiranim recikliranjem suspenzije

## Šaržni postupak s kontinuiranim recikliranjem suspenzije

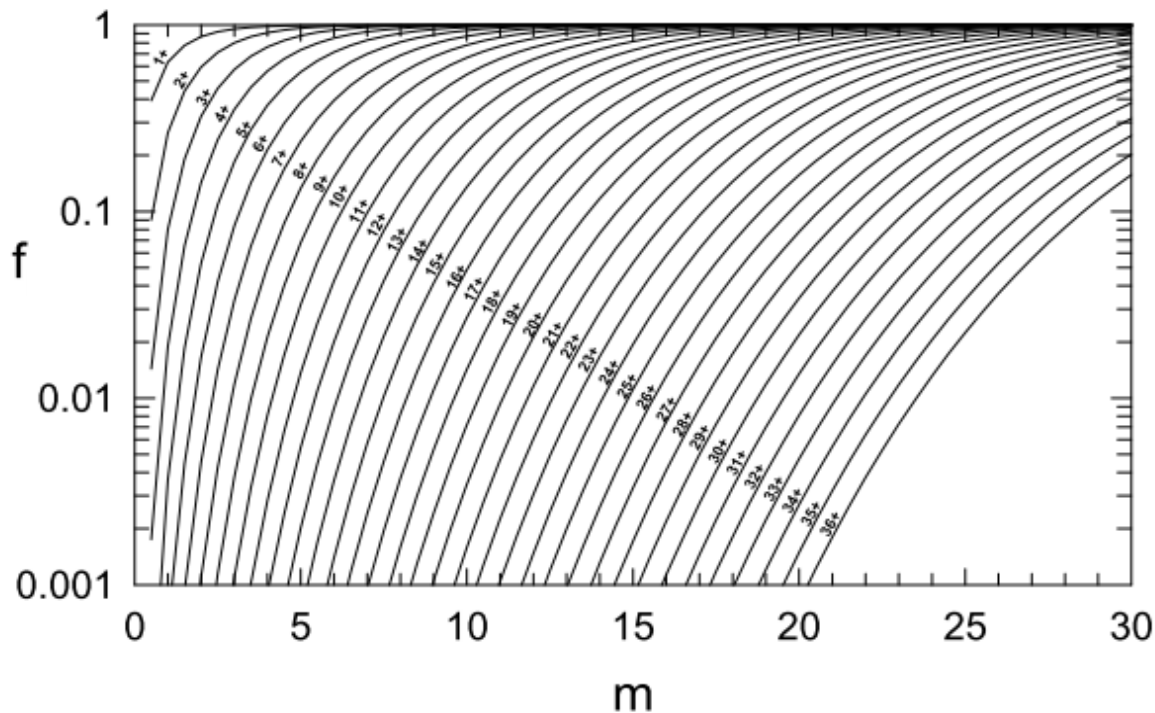


Statističkom analizom prinosa proizvoda uz pretpostavku idealnog miješanja suspenzije u tanku dobivena je matematička ovisnost volumnog udjela suspenzije ( $f$ ) koji je obrađen  $\geq N$  puta puta u homogenizatoru o broju prolaska suspenzije kroz homogenizator ( $m$ ):

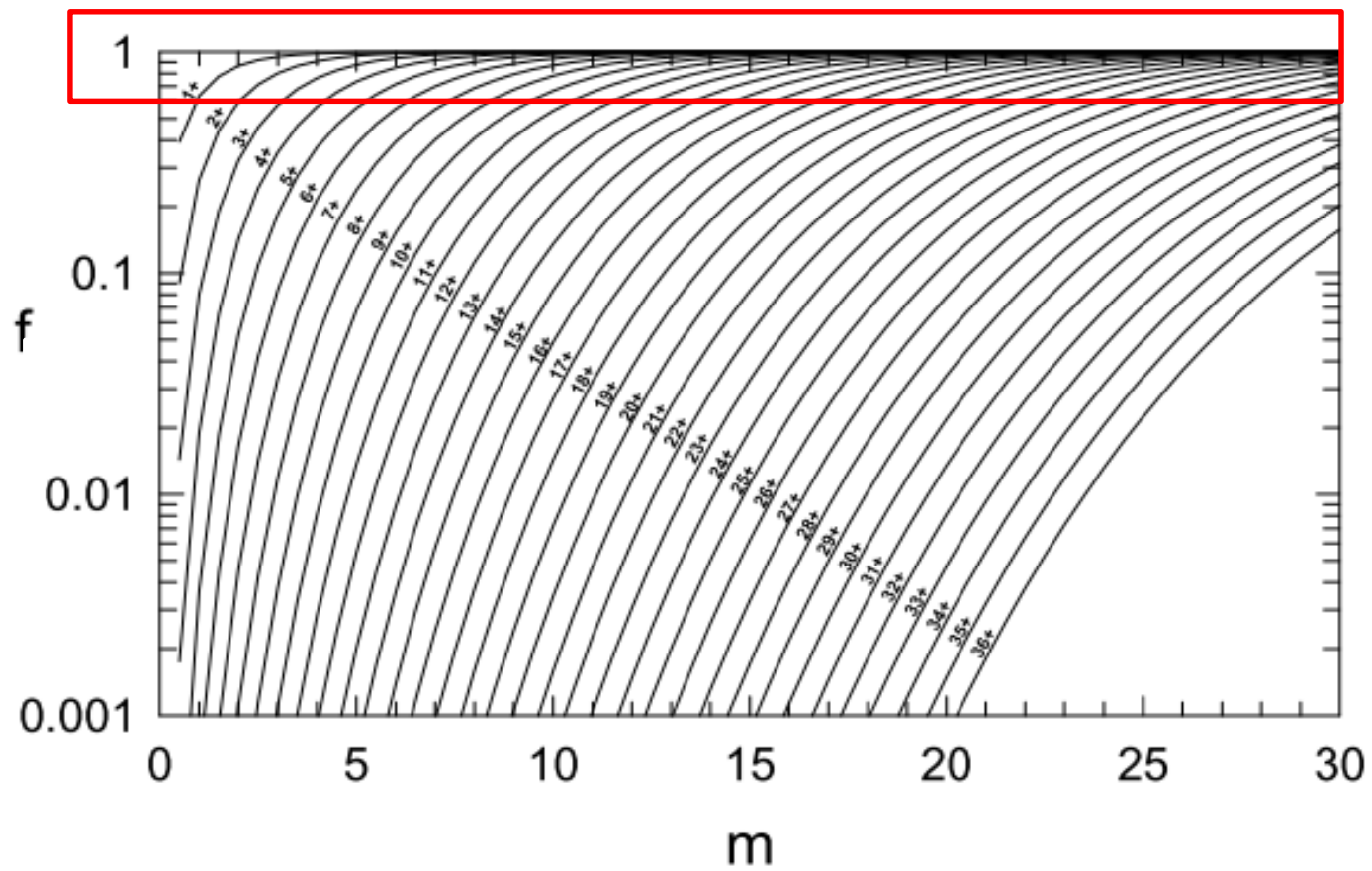
$$f = \frac{m^N \cdot e^{-m}}{N!}$$

$f$ - volumeni udjel suspenzije koja je obrađena  $\geq N$  puta u homogenizatoru  
 $m$ - broj prolaza suspenzije stanica kroz homogenizator (prosječna vrijednost)

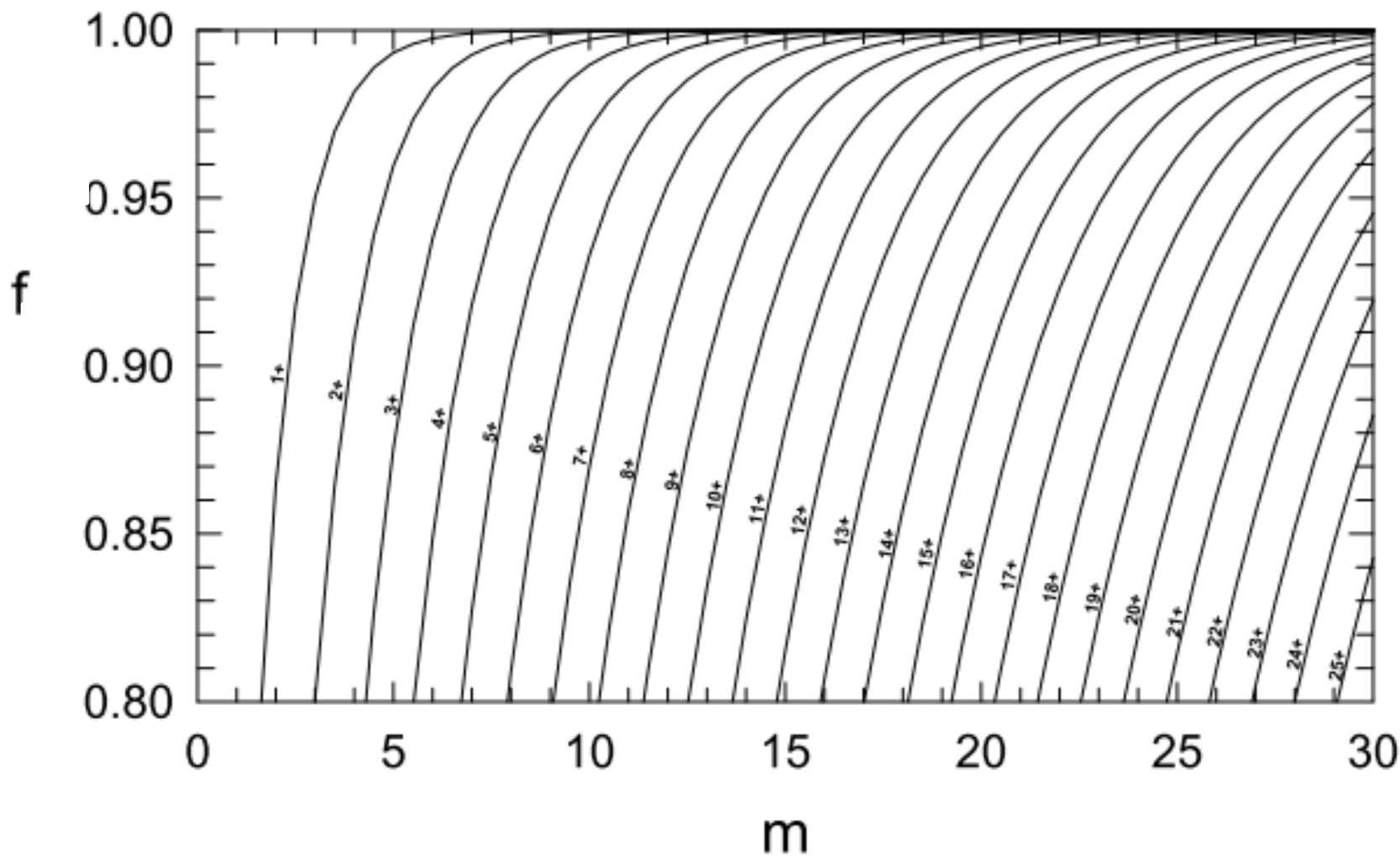
Grafički prikaz prethodne jednadžbe omogućuje jednostavnije izračunavanje parametara obrade u visokotlačnom homogenizatoru. Na slici je prikazan niz krivulja ovisnosti volumnog udjela suspenzije ( $f$ ) o ukupnom broju obrada u homogenizatoru ( $m$ , 1-30) za svaki zadani minimalni broj obrada suspenzije ( $N$ ; 1-36)



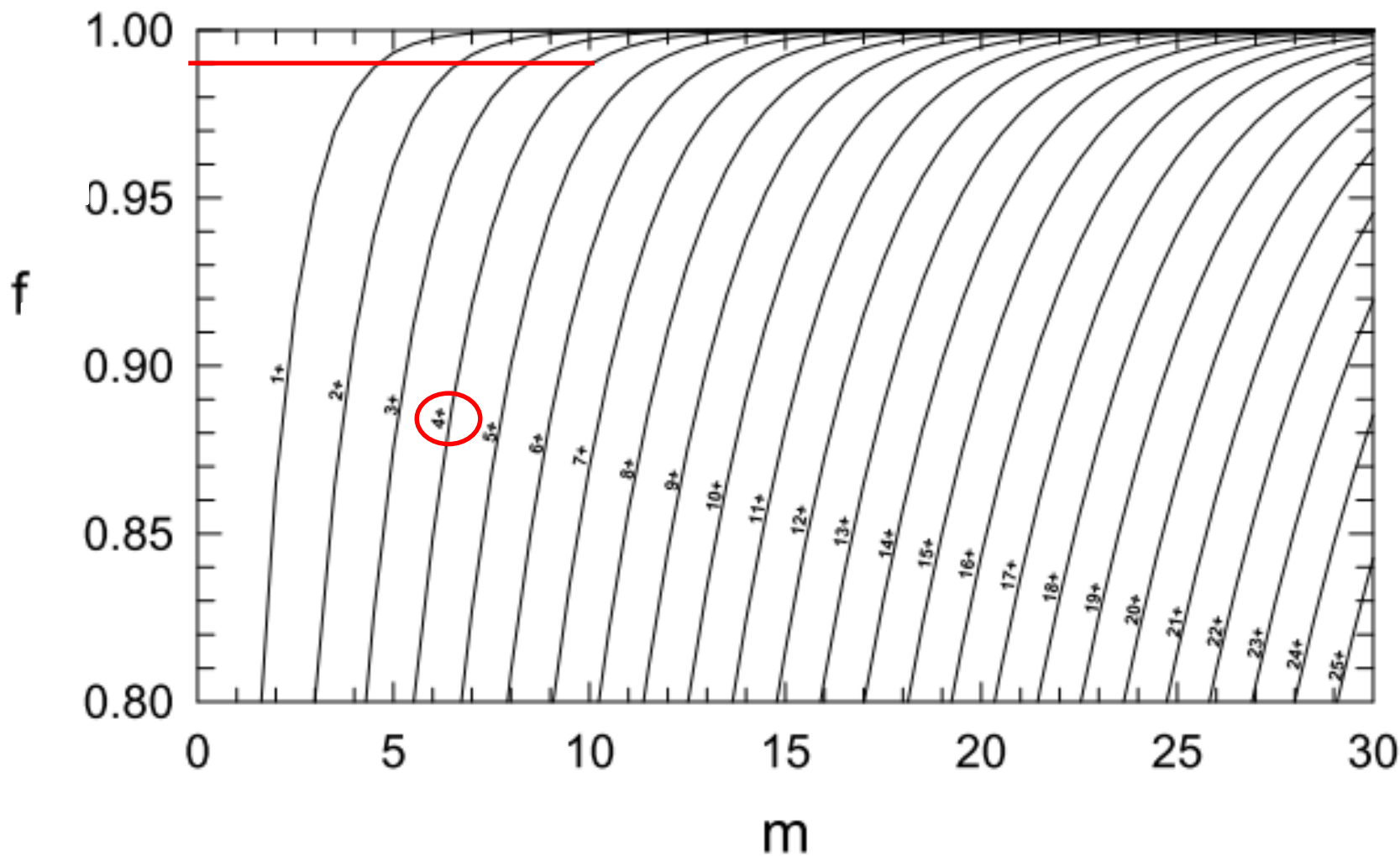
Ovisnost volumnog udjela suspenzije ( $f$ ) o broju postupka obrade u homogenizatoru ( $m$ ).



U zadatku je zadano da 99 % (vo/vol) suspenzije stanica mora biti obrađeno u homogenizatoru minimalno 4 puta. Ukupan broj obrada suspenzije u homogenizatoru ( $m$ ) očita se iz dijagrama tj. krivulje za određeni minimalni broj prolaza ( $N=4+$ ) i uz zadani  $f(0,99)$ . 99 % suspenzije stanica obrađeno je minimalno 4 puta u homogenizatoru.

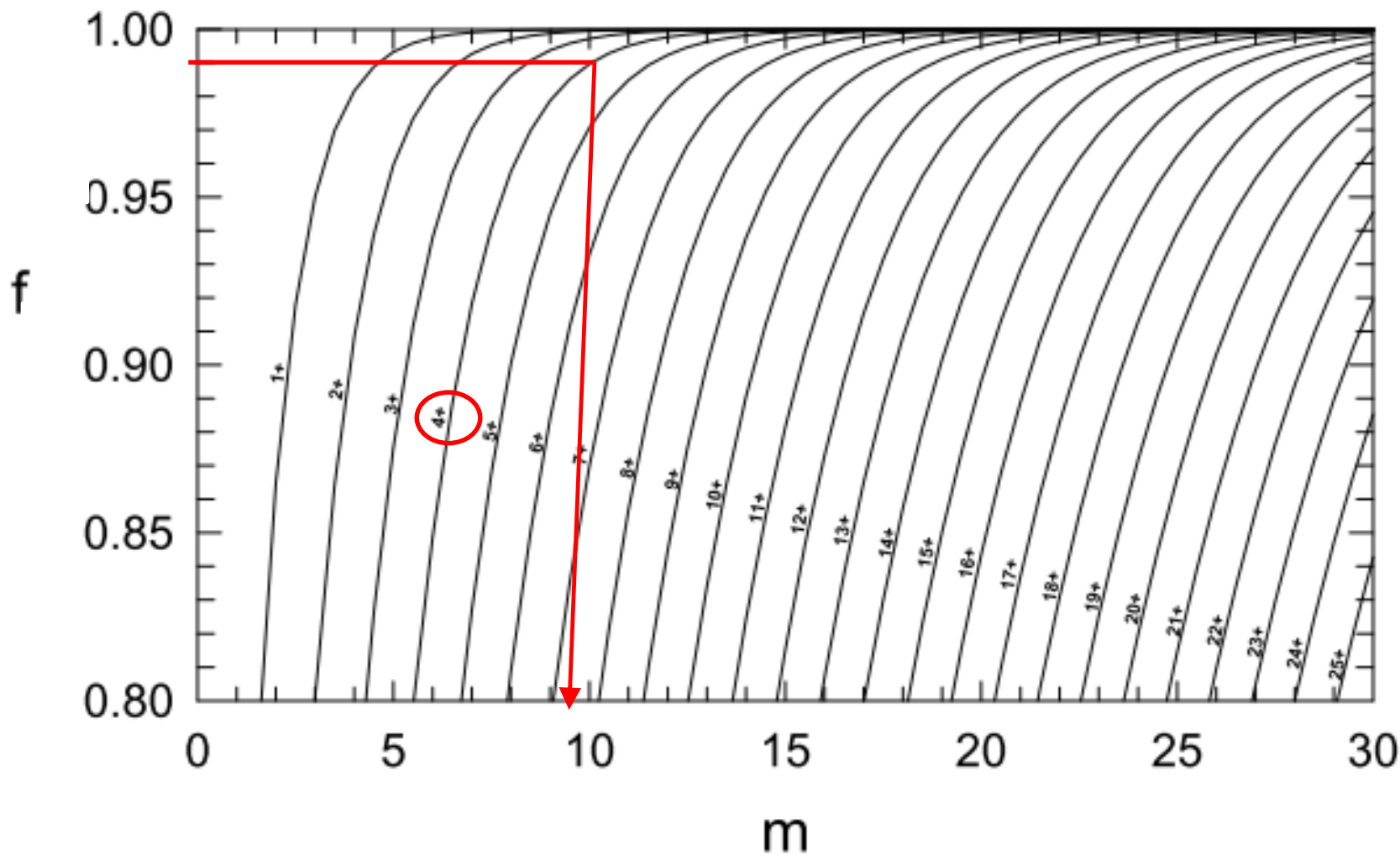


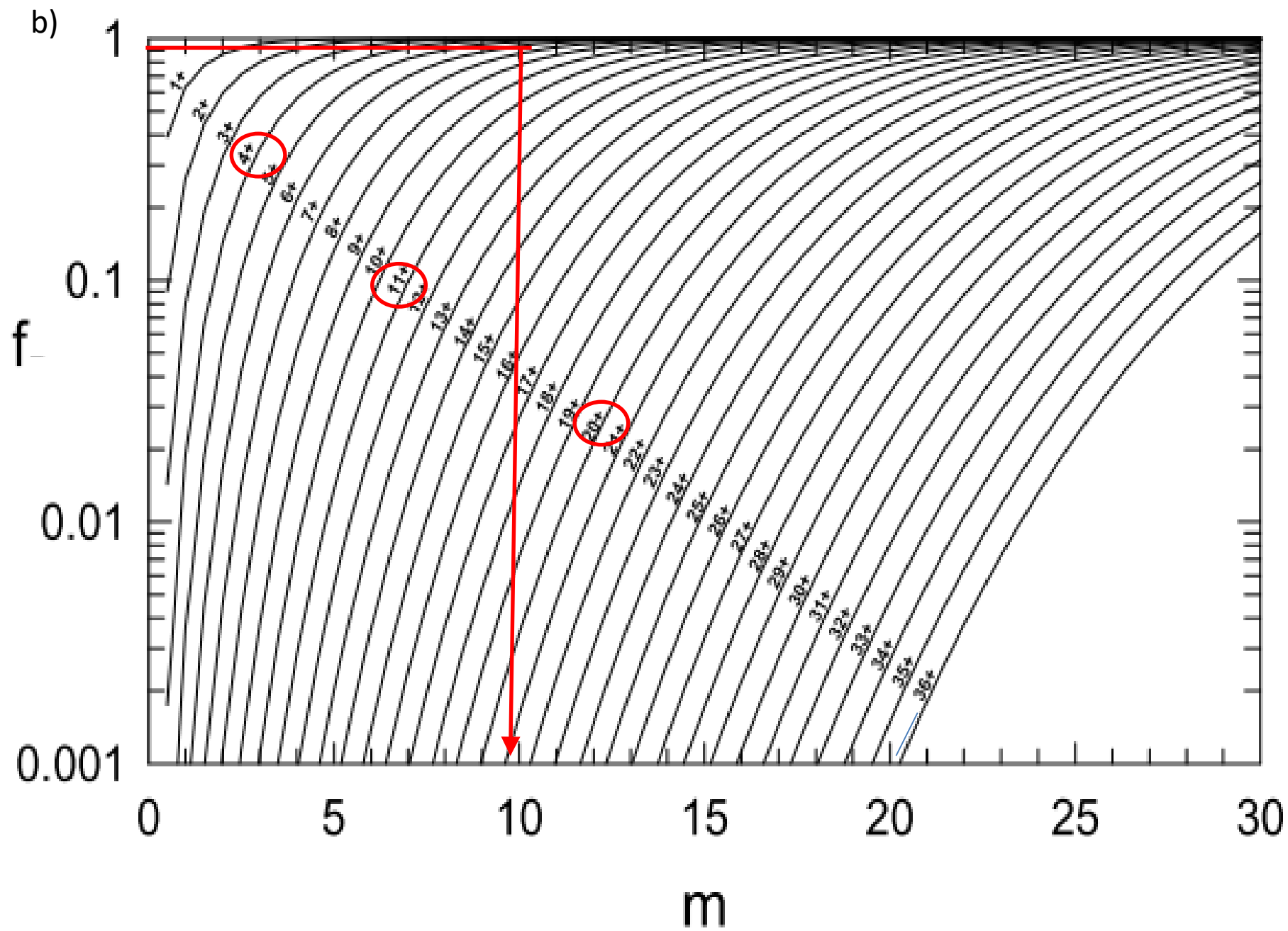
U zadatku je zadano da 99 % (vo/vol) suspenzije stanica mora biti obrađeno u Homogenizatoru minimalno 4 puta. Ukupan broj obrada suspenzije u homogenizatoru (m) očitava se iz dijagrama tj. krivulje za određeni minimalni broj prolaza (N=4+) i uz zadani f (0,99). Više od 99 % suspenzije stanica obrađeno je minimalno 4 puta u homogenizatoru.



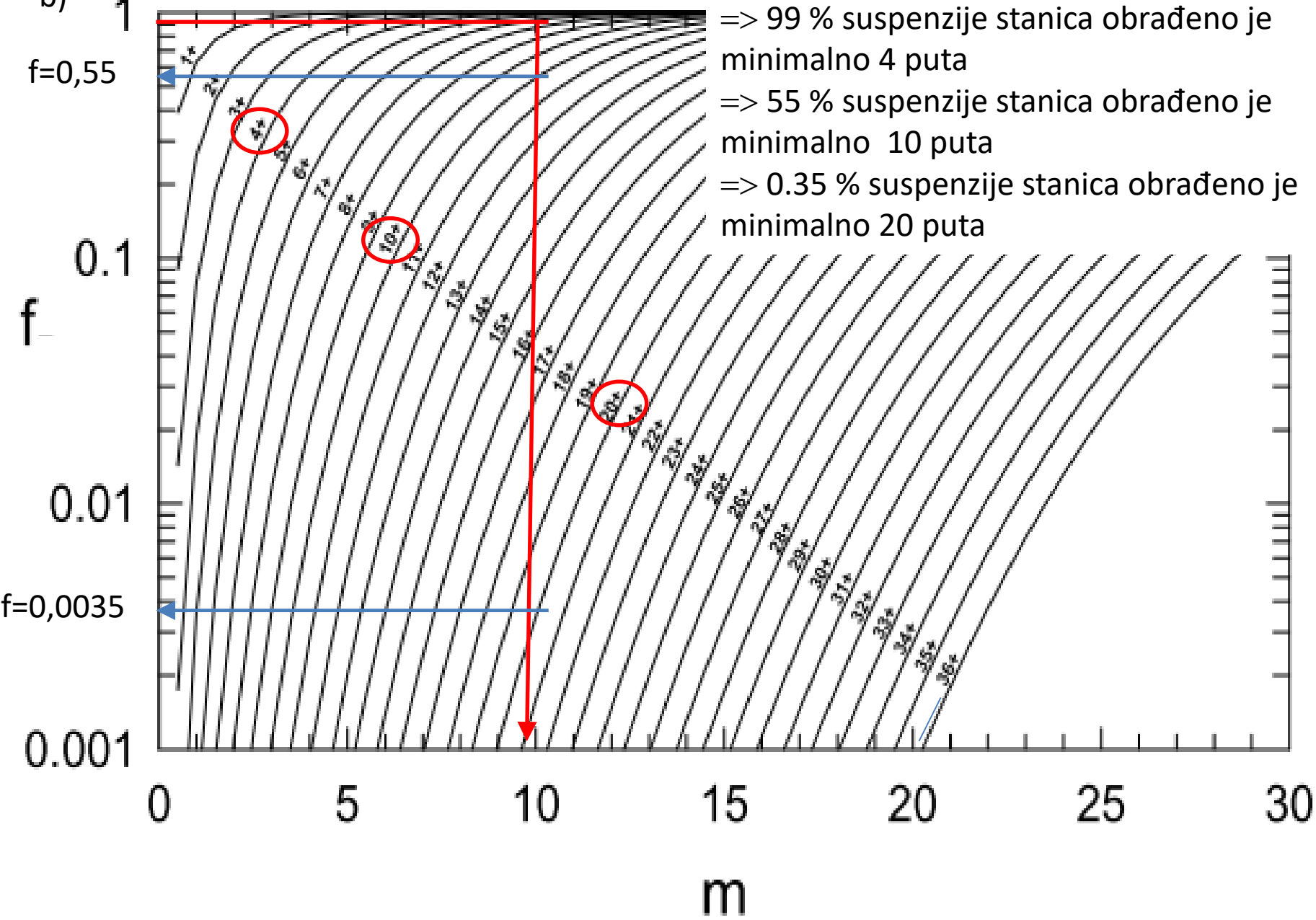


U zadatku je zadano da 99 % (vo/vol) suspenzije stanica mora biti obrađeno u homogenizatoru minimalno 4 puta. Ukupan broj obrada suspenzije u homogenizatoru ( $m$ ) očita se iz dijagrama tj. krivulje za određeni minimalni broj prolaza ( $N=4+$ ) i uz zadani  $f(0,99)$ . Više od 99 % suspenzije stanica obrađeno je minimalno 4 puta u homogenizatoru.





b)

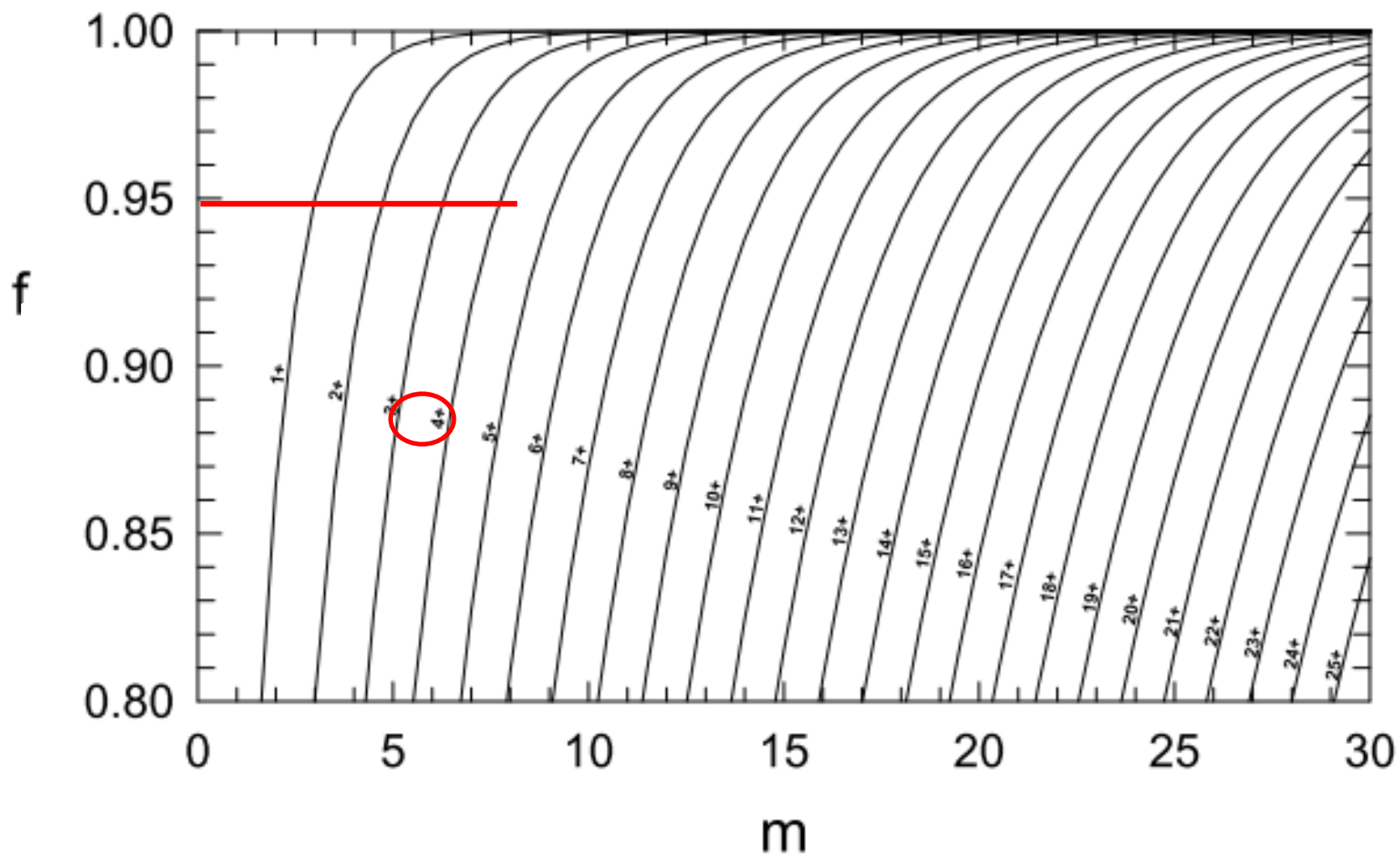


=> 99 % suspenzije stanica obrađeno je minimalno 4 puta

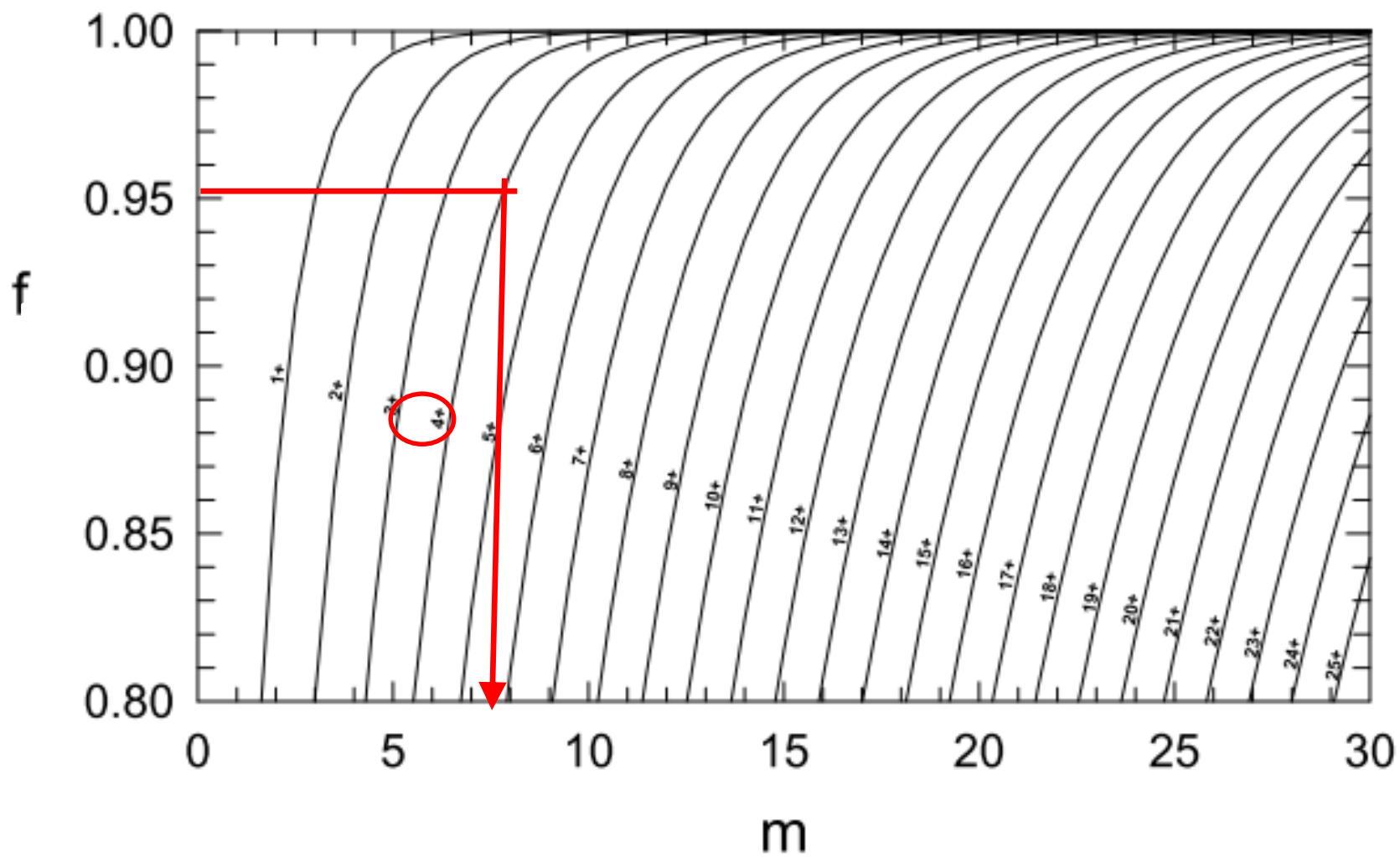
=> 55 % suspenzije stanica obrađeno je minimalno 10 puta

=> 0.35 % suspenzije stanica obrađeno je minimalno 20 puta

c)



c)



c)

